ПАРАЗИТОЛОГИЯ, 23, 3, 1989

УДК 576.895.121 : 591.133.13

ТРАНСПОРТ НЕКОТОРЫХ УГЛЕВОДОВ У ЦЕСТОДЫ TRIAENOPHORUS NODULOSUS

Г. И. Извекова

Доказано существование системы активного транспорта глюкозы у цестоды *Triaenophorus nodulosus*. Вычислены ее кинетические характеристики. Изучена абсорбция различных форм глюкозы. Показана зависимость транспортных процессов от физиологического состояния цестод.

Важным и завершающим этапом в усвоении нутриентов после их гидролитического расщепления является транспорт продуктов гидролиза. Поскольку у цестод отсутствует пищеварительный тракт, все абсорбируемые вещества поступают в тело гельминтов через наружные покровы тела — тегумент, морфологически сходный со щеточной каймой кишечника позвоночных (Smyth, 1972; Lumsden, 1975; Куперман, 1980). В литературе имеются сведения о существовании у цестод систем для опосредованного поглощения органических веществ из окружающей среды (Pappas, Read, 1975; Шишова-Касаточкина, 1979), причем наблюдается сходство этих систем и механизмов транспорта с аналогичными процессами, протекающими у хозяев цестод — позвоночных. С помощью использования специальных методических подходов различают несколько видов транспорта веществ через мембраны (диффузия, облегченная диффузия и активный транспорт) (Pappas, Read, 1975). Определение вида абсорбции имеет принципиальное значение, так как позволяет установить эффективность ферментативно-транспортных систем.

Кузьминой и Куперманом (1983) показана возможность осуществления заключительных этапов гидролиза углеводов на поверхности тела цестод *T. nodulosus* и *E. rugosum* и участие процессов мембранного пищеварения в усвоении пищи у ленточных червей. В литературе имеются сведения о сопряжении гидролиза и транспорта на поверхности кишечника позвоночных (Уголев, Иезуитова, 1985). Представляет интерес исследование возможности осуществления аналогичных процессов на поверхности гельминтов. В связи с этим целью данной работы явилось изучение поглощения свободной глюкозы и глюкозы, освободившейся в результате гидролиза мальтозы и крахмала у цестоды *T. nodulosus*. Транспортные процессы у этого вида цестод ранее не исследовались.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объектом исследований служили цестоды *T. nodulosus*, обитающие в кишечнике щуки, *Esox lucius* (L). Материал собран в зимне-весенний период. Гельминтов исследовали через 1—2 ч после их извлечения из кишечника. Цестод помещали в раствор Рингера для холоднокровных животных (pH 7.4) и удаляли ферменты, адсорбированные на поверхности тегумента промыванием в 3 объемах (по 50 мл) раствора Рингера, модифицированным методом Рида (Read, 1973). Затем червей осушали фильтровальной бумагой, резали на кусочки 4—6 см и помещали в инкубационный раствор. Инкубацию проводили в 5 мл раствора глюкозы (в концентрации от 0.1 до 10 мМ), мальтозы или крахмала (концентрации эквимолярные 5 и 10 мМ глюкозе), приготовленные на растворе Рингера для холоднокровных животных при температуре 5 и 20°. В тканях червей определяли интенсивность аккумуляции мономера глюкозы (Г-глюкоза) и глюкозы, образующейся при гидролизе дисахарида мальтозы (М-глюкоза) и полисахарида крахмала (К-глюкоза), о которой судили по приросту гексоз в течение 60 мин инкубации. Концентрацию гексоз определяли при помощи модифицированного метода Нельсона (Уголев, Иезуитова, 1969). Интенсивность аккумуляции выражали в мМ глюкозы в расчете на 100 мг сырого веса гельминтов. При исследовании механизмов транспорта использовали ингибитор Na^+, K^+-АТФазы — оуабаин в концентрации 10^{-4} мМ.

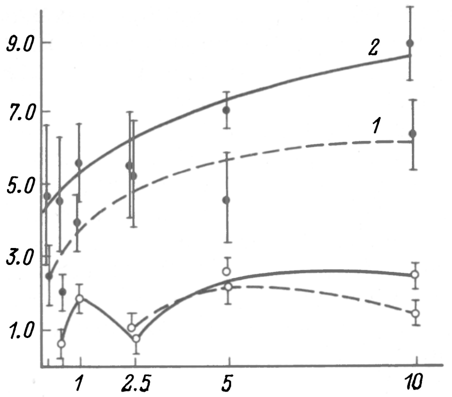
РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Интенсивность аккумуляции глюкозы. Для выяснения механизмов поглощения глюкозы *T. nodulosus* были поставлены опыты по определению интенсивности аккумуляции глюкозы в теле гельминта в зависимости от ее концентрации в инкубационном растворе. Исследованные гельминты в соответствии с их физиологическим состоянием (Куперман, 1973) разделены на две группы: 1-я — черви незрелые с формирующимися гонадами, из кишечников рыб, отловленных в декабре—январе и 2-я — половозрелые черви из кишечников рыб, отловленных в феврале—апреле. Черви этих групп отличались визуально: при промывании 2-й группы в раствор выходило большое количество яиц.

При анализе полученных транспортных характеристик были обнаружены различия: 1-я группа гельминтов аккумулировала глюкозу значительно интенсивнее, чем вторая (рис. 1). При этом абсорбция глюкозы у червей с формирующимися гонадами при 5° несколько ниже, чем при 20°, но при обеих исследованных температурах носит характер кинетики насыщения. При содержании в инкубационной среде от 0.1 до 5 мМ глюкозы в тканях гельминта этот моносахарид накапливается против градиента концентрации. Так, например, интенсивность ее аккумуляции в этих условиях при 20° увеличивается с 4.79 ± 1.94 до 6.95 ± 0.48 мМ. Кинетика насыщения и накопление глюкозы против концентрационного градиента свидетельствуют о наличии активного компонента транспорта у исследованных гельминтов.

Абсорбция глюкозы у половозрелых червей примерно одинакова при 5 и 20°. Накопление ее против концентрационного градиента наблюдается при концентрации глюкозы в инкубационном растворе только 0.5 и 1 мМ: интенсивность аккумуляции составляет 0.54 ± 0.30 и 2.38 ± 0.36 мМ соответственно, что значительно ниже аналогичных показателей для червей 1-й группы. Черви 2-й группы не показали четкой кинетики насыщения (рис. 1). Это свидетельствует о снижении интенсивности транспортных процессов у половозрелых червей по сравнению с червями, у которых идет формирование гонад. Полученные результаты хорошо согласуются с данными Рида и соавторов (Read e. a., 1963), которые показали, что на характеристики транспортных процессов влияют такие факторы, как возраст и степень зрелости паразита, число паразитов в хозяине, пол и возраст хозяина.

По данным разных авторов, все изученные цестоды используют активный механизм транспорта глюкозы (Pappas, Read, 1975), причем диффузионный компонент, как правило, пренебрежимо мал. Исходя из этих данных и кривых кинетики насыщения, полученных для 1-й группы червей, удалось определить константы абсорбции для этих гельминтов: V_{max} — максимальную скорость транспорта и K_m — константу Михаэлиса для транспортных процессов при



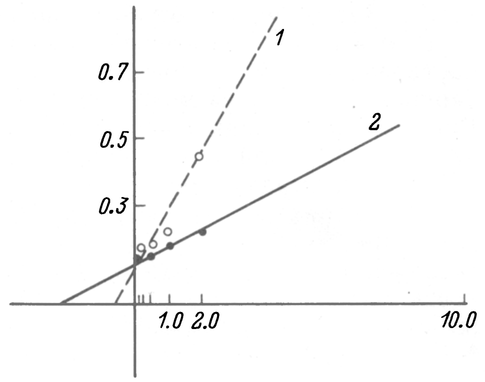


Рис. 1. Интенсивность аккумуляции глюкозы в зависимости от ее концентрации в среде цестод *T. nodulosus*.

По оси абсцисс — концентрация глюкозы в среде, мМ; по оси ординат — интенсивность аккумуляции глюкозы, мМ: *1,2* — температура: 5 и 20° соответственно, темные кружки — незрелые черви, светлые кружки — половозрелые черви.

Рис. 2. Кинетика интенсивности аккумуляции глюкозы цестодой *T. nodulosus*.

По оси абсцисс — величина, обратная концентрации глюкозы в среде; по оси ординат — величина, обратная интенсивности поглощения.
Обозначения такие же, как на рис. 1.

разной температуре — 5 и 20° (рис. 2). Оказалось, что значения V_{max}^{20} и V_{max}^{5} равны и составляют 7.69 мМ и отношение V_{max}^{20}/V_{max}^{5} равно единице. Транспортные константы K_m^{20} и K_m^{5} значительно различаются (K_m^{20} — 0.40 и K_m^{5} — 1.43 мМ соответственно), а отношение K_m^{20}/K_m^{5} меньше единицы (0.28). Значение константы Михаэлиса — важная кинетическая характеристика, отражающая сродство транспортной системы к транспортируемому веществу (чем ниже K_m, тем больше сродство системы к субстрату).

Таким образом, при 20° сродство транспортной системы у *T. nodulosus* к транспортируемой глюкозе выше, чем при 5°. Аналогичная зависимость констант абсорбции от температуры ранее была показана нами для цестоды *E. rugosum*, паразитирующей в кишечнике налима. Большее сродство фермента к субстрату при 20° по сравнению с 0° показано для карбогидраз кишечника рыб и, в частности, щуки (Кузьмина, 1986).

Интенсивность аккумуляции различных форм глюкозы. При исследовании абсорбции различных форм глюкозы с использованием в качестве субстратов глюкозы, мальтозы или крахмала наблюдались различия в аккумуляции Г-, М- и К-форм глюкозы между группами незрелых и половозрелых червей. Так, аккумуляция К-глюкозы отмечена только у червей 1-й группы при 20° (рис. 3). Как указывалось выше, интенсивность аккумуляции Г-глюкозы при всех испытанных условиях выше у незрелых червей. М-глюкоза аккумулировалась примерно одинаково обеими группами независимо от условий опыта. Однако незрелые черви абсорбировали Г-глюкозу интенсивней, чем М-глюкозу, в то время как между интенсивностью аккумуляции этих форм глюкозы у половозрелых червей значительной разницы нет (рис. 3). Заметного влияния температуры на указанные процессы также не обнаружено.

При исследовании пищеварительно-транспортных процессов у различных групп животных установлено, что негидролизованная мальтоза не транспортируется (Уголев, Иезуитова, 1985). В наших опытах в среде с мальтозой наблюдалось накопление глюкозы в тканях червей, что дает основание предположить существование процессов гидролиза мальтозы на поверхности *T. nodulosus*. Ранее ряд авторов указывали на осуществление заключительных этапов гидро-

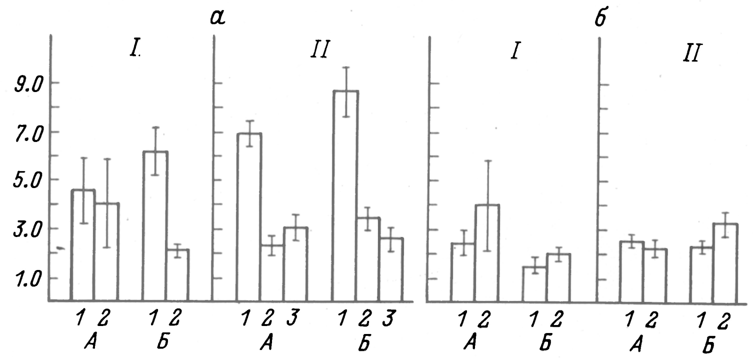


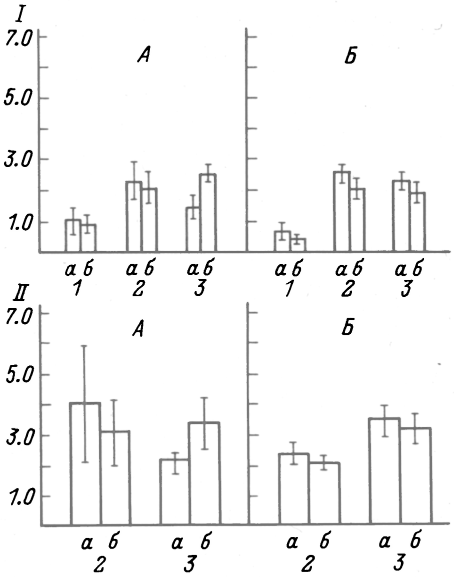
Рис. 3. Интенсивность аккумуляции различных форм глюкозы цестодой *T. nodulosus*.

По оси абсцисс — формы глюкозы: *1* — Г-глюкоза, *2* — М-глюкоза, *3* — К-глюкоза; по оси ординат — интенсивность аккумуляции глюкозы, мМ. *А* — концентрация субстрата, эквимолярная 5 мМ раствору глюкозы, *Б* — концентрация субстрата, эквимолярная 10 мМ раствору глюкозы: *I*, *II* — температура: 5 и 20° соответственно, *а* — незрелые черви, *б* — половозрелые черви.

лиза на поверхности тегумента некоторых циклофиллидных цестод и на участие его в процессах пищеварения (Аркинд, Раева, 1971; Taylor, Thomas, 1968, и др.). Полученные нами данные подтверждают участие процессов мембранного пищеварения в усвоении пищи у цестод, что хорошо согласуется с представлениями о сопряжении гидролиза и транспорта в кишечнике их хозяев — рыб (Кузьмина и др., 1986).

В экспериментах по выяснению действия на аккумуляцию сахаров оуабаина — специфического ингибитора Na$^+$, K$^+$-АТФазы, поставленных на 2-й группе червей, не установлено существенного его влияния на аккумуляцию Г- и М-глюкозы (рис. 4). Видимо, доля активного Na$^+$-зависимого компонента у этой группы червей мала. Это, вероятно, связано с возрастными изменениями, созреванием половых продуктов и завершением жизненного цикла у этой группы червей в исследуемый период. Вместе с тем в ряде работ получены данные, свидетельствующие о том, что все изученные виды цестод используют активный механизм транспорта глюкозы и поглощение ее зависит от присутствия Na$^+$ в окружающей среде и частично или полностью ингибируется оуабаином. Для цестод *Hymenolepis diminuta* и *H. microstoma*, обитающих в кишечнике крыс, найдено незначительное ингибирование оуабаином транспорта глюкозы (Pappas, Read, 1975).

«Фоновое» содержание глюкозы и интенсивность ее аккумуляции в различных участках тела *T. nodulosus*. В тканях цестод *T. nodulosus* было измерено «фоновое» содержание глюкозы, т. е. ее количество в тканях гельминта при отсутствии этого мономера в инкубационной среде. Учитывалось количество глюкозы, улавливаемое применяемым методом, в слое, доступном диффузионным процессам. У гельминтов 2-й группы был также определен градиент содержания глюкозы вдоль тела *T. nodulosus* (рис. 5). Для этого исследованных особей условно делили на две части: 1 — передний отдел (зона сколекса, шейки и формирующихся гонад) и 2 — задний отдел (содержит половозрелые гонады). В результате проведенных опытов оказалось, что содержание глюкозы в тканях *T. nodulosus* резко снижается в заднем отделе по сравнению с передним (от 12.65±1.47 до 4.53±0.70 мМ). Снижение содержания глюкозы вдоль тела *T. nodulosus*, видимо, связано с постепенным созреванием половых продуктов и запасанием резервного гликогена в направлении от сколекса к заднему отделу. Ранее аналогичные данные были получены нами для цестоды *Eubothrium rugosum*, обитающей в кишечнике налима. У цестод из 1-й группы «фоновое» содержание глюкозы несколько ниже и составляет 3.12±0.62 мМ. Данные о высокой концентрации глюкозы, способ-



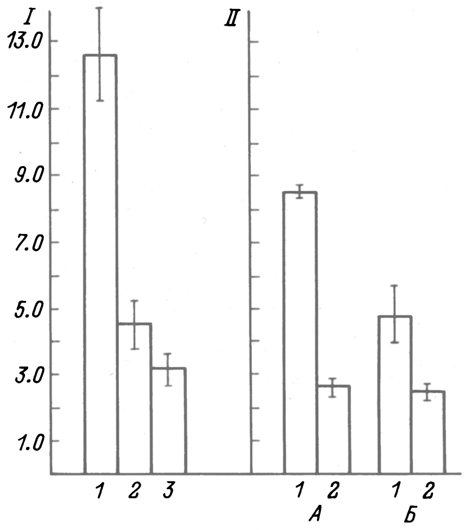


Рис. 4. Влияние оуабаина на интенсивность аккумуляции различных форм глюкозы цестодой *T. nodulosus*.

По оси ординат — интенсивность аккумуляции глюкозы, мМ: *I* — Г-глюкоза, *II* — М-глюкоза, *1* — концентрация субстрата, эквимолярная 2,5 мМ раствору глюкозы; *2* — концентрация субстрата, эквимолярная 5 мМ раствору глюкозы; *3* — концентрация субстрата, эквимолярная 10 мМ раствору глюкозы; *а* — контроль, *б* — оуабаин; *А*, *Б* — температура: 5 и 20° соответственно.

Рис. 5. Содержание глюкозы (*I*) и интенсивность ее аккумуляции (*II*) в различных участках тела *T. nodulosus*.

По оси абсцисс — отделы тела: *1* — передний половозрелых червей, *2* — задний половозрелых червей, *3* — задний незрелых червей; по оси ординат: *I* — содержание глюкозы, мМ; *II* — интенсивность аккумуляции глюкозы, мМ; *А* — концентрация субстрата 5 мМ, *Б* — концентрация субстрата 10 мМ.

ной экстрагироваться из тканей гельминтов, свидетельствуют о противоградиентном ее накоплении и доказывают, что глюкоза поступает в червя активным путем, поскольку при концентрации глюкозы в инкубационном растворе более низкой, чем в гельминте, поступление ее в цестоду может происходить только активно.

В связи с тем что тегумент морфологически неоднороден (Куперман, 1980) и выявлен градиент содержания глюкозы в стробиле *T. nodulosus*, интересно было сравнить интенсивность транспортных процессов в различных участках тела. Для этого у 2-й группы червей определяли абсорбцию глюкозы в переднем и заднем отделах. При этом оказалось, что при концентрации глюкозы в среде 5 мМ интенсивность ее аккумуляции в переднем отделе составляет 8.41±0.12, а в заднем — 2.56±0.31 мМ, что свидетельствует о противоградиентном накоплении этого мономера в переднем отделе. При содержании глюкозы в среде 10 мМ интенсивность ее аккумуляции составляет 4.74±0.90 и 2.38±0.25 мМ соответственно в переднем и заднем отделах. Из полученных данных видно, что при обеих испытанных концентрациях транспортные процессы протекают в переднем отделе в 2—3 раза интенсивней, чем в заднем, что, по-видимому, связано с процессами постепенного формирования половых продуктов вдоль тела червей. Интересно также отметить, что значения транспортных характеристик для переднего отдела половозрелых червей (8.41±0.12 при 5 мМ концентрации глюкозы в растворе) ближе к аналогичным значениям для всего тела незрелых червей (6.95±0.48 мМ), чем к значениям этих характеристик для их заднего отдела (2.56±0.31 мМ). Это, по-видимому, связано с физиологическими изменениями в разных участках тела гельминтов: передний отдел более молодой, так же как и черви 1-й группы не содержит сформированных гонад, и обменные процессы, включающие транспорт нутриентов, протекают в них интенсивней, чем в заднем отделе с половозрелыми гонадами.

Таким образом, приведенные материалы свидетельствуют о существовании системы активного транспорта глюкозы у *T. nodulosus*. Системы и механизмы, участвующие в абсорбции пищевых веществ паразитами имеют первостепенное значение, поскольку паразитизм в значительной степени определяется пищевыми отношениями. Интенсивность системы транспорта глюкозы у изученной цестоды сопоставима, а в ряде случаев более эффективна, чем у некоторых видов рыб (Кузьмина и др., 1986). У *T. nodulosus* четко прослеживается зависимость транспортных процессов от физиологического состояния как между червями 1-й и 2-й групп, так и вдоль тела червей. Существование градиента содержания глюкозы и интенсивности ее аккумуляции вдоль тела также свидетельствует о функциональной неравномерности в пищеварительных процессах червя. Кроме того, показано, что кинетические характеристики транспортной системы *T. nodulosus* непостоянны и зависят от температуры, что согласуется с данными по влиянию температуры на кинетические параметры карбогидраз щуки, а также с данными изученной ранее цестоды *E. rugosum*. Существенного Na^+-зависимого компонента у *T. nodulosus* не обнаружено. Полученные данные по аккумуляции глюкозы в среде с крахмалом и мальтозой позволяют предположить существование сопряжения процессов гидролиза и транспорта на поверхности тегумента, что свидетельствует о сходстве процессов пищеварения у паразитов и их хозяев.

Литература

Products of Аркинд М. В., Раева И. И. Мембранное (пристеночное) пищеварение у цестод // ЖЭБиР. 1971. Т. 7, № 4. С. 375—379.

Кузьмина В. В. Общие закономерности мембранного пищеварения у рыб и его адаптивные перестройки // Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. Л., 1986. 39 с.

Кузьмина В. В., Голованова И. Л., Извекова Г. И. Особенности транспорта углеводов в кишечнике рыб // Мембранное пищеварение и всасывание. Рига, 1986. С. 72—74.

Кузьмина В. В., Куперман Б. И. Сравнительная характеристика мембранного пищеварения у цестод и их хозяев — рыб // Паразитология. 1983. Т. 17, вып. 6. С. 436—442.

Куперман Б. И. Ленточные черви рода Triaenophorus — паразиты рыб // Л.: Наука, 1973.

Куперман Б. И. Ультраструктура покровов цестод и ее значение для систематики // Паразитол. сб. ЗИН АН СССР. 1980. Т. 29. С. 84—95.

Уголев А. М., Иезуитова Н. Н. Определение активности инвертазы и других дисахаридаз // Исследования пищеварительного аппарата у человека (обзор совр. методов). Л.: Наука, 1969. С. 192—196.

Уголев А. М., Иезуитова Н. Н. Мембранное пищеварение. Структурная и функциональная организация // Усп. физиол. наук. 1985. Т. 16, № 4. С. 3—34.

Шишова-Касаточкина О. А. Активный транспорт и особенности потребления аминокислот у гельминтов // Биохимические аспекты взаимоотношений гельминта и хозяина. М.: Наука, 1979. С. 65—81.

Lumsden J. D. Surface ultrastructure and cytochemistry of parasitic helminths // Exp. Parasitol. 1975. Vol. 37, N 2. P. 267—339.

Pappas P. W., Read C. P. Membrane transport in helminth parasites: a review // Exp. Parasitol. 1975. Vol. 37, N 3. P. 469—530.

Read C. P. Contact digestion in tapeworms // J. Parasitol. 1973. Vol. 59. P. 672—677.

Read C. P., Rothman A. H., Simmons J. E. Studies on membrane transport with special reference to parasite-host integration // Annals of the New York Acad. of Science. 1963. Vol. 113. P. 154—205.

Smyth J. D. Changes in the digestive-absorptive surface of cestodes during larval adult differentiation // Symp. Brit. Soc. Parasit. 1972. Vol. 10. P. 41—70.

Taylor E. W., Thomas J. N. Membrane (contact) digestion in three species of tapeworm Hymenolepis diminuta, Hymenolepis microstoma and Moniezia expansa // Parasitol. 1968. Vol. 58. N 3. P. 535—546.

ИБВВ им. И. Д. Папанина АН СССР
Борок Ярославской обл.

Поступила 31.12.1987

THE TRANSPORT OF SOME CARBOHYDRATES IN THE CESTODE TRIAENOPHORUS NODULOSUS

G. I. Izvekova

SUMMARY

The data demonstrating the presence of the glucose active transport system in the cestode *T. nodulosus* are obtained. Kinetic characteristics of the transport are estimated and their dependence on the incubation temperature are shown. Heterogeneity of the worm body in respect to transport processes and their dependence on the physiological state of cestodes are discovered. The absorption of different forms of glucose is studied and the similarity of digestion processes in parasites and their hosts is shown.